

· 实验研究 ·

## BCG 干预对哮喘小鼠调节性 T 细胞生成的影响

夏煜<sup>1</sup>, 张建华<sup>2</sup>, 季正华<sup>3</sup>, 李晓狄<sup>3</sup>, 郁志伟<sup>3</sup>, 刘海燕<sup>3</sup>

(1. 溧水县人民医院儿科, 江苏 南京 211200; 2. 上海第六人民医院儿科, 上海 215003;

3. 苏州大学附属儿童医院, 江苏 苏州 215003)

**[摘要]** 目的 研究表明减毒活菌卡介苗(BCG)能上调机体的 Th1 反应,从而对以 Th2 反应为主的哮喘等过敏性疾病起抑制作用。该文观察 BCG 干预后哮喘小鼠调节性 T 细胞生成的变化,以探讨其可能的作用机制。**方法** 昆明小鼠以卵白蛋白(OVA)致敏激发建立哮喘模型。于 OVA 致敏前及后 5 d 分别以 BCG 皮内注射干预,在最后一次抗原激发后 24 h 收集支气管肺泡灌洗液(BALF)和外周血。计数 BALF 中的细胞总数及嗜酸性粒细胞(EOS)的个数。并采用流式细胞仪分析外周血 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>调节性 T 细胞(Treg)的百分比。开腹取脾,制备脾单细胞悬液并培养 48 h,收集上清液。ELISA 法测定上清液中的 IL-10 的含量。**结果** OVA 致敏激发组小鼠 BALF 中的细胞总数为  $(27.27 \pm 5.36) \times 10^7/L$ ; EOS 为  $(6.59 \pm 1.32) \times 10^7/L$  较正常对照组  $(1.52 \pm 0.36) \times 10^7/L$  和 0 明显增高( $P < 0.01$ ),而 BCG 干预组其 BALF 中的细胞总数为  $(13.71 \pm 3.17) \times 10^7/L$  及 EOS 的计数为  $(1.43 \pm 0.37) \times 10^7/L$  较 OVA 致敏激发组降低( $P < 0.01$ );哮喘组外周血 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup> Treg 的百分比为  $(11.59 \pm 1.33)\%$  与正常对照组  $(13.66 \pm 1.68)\%$  比较明显下降( $P < 0.01$ )。而 BCG 干预组 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup> Treg 的百分比为  $(14.40 \pm 2.70)\%$  较哮喘组上升( $P < 0.05$ ),同时,BCG 干预组脾细胞培养上清液中 IL-10 的水平为  $7.79 \pm 1.34 \text{ pg/mL}$ ,较哮喘组  $5.54 \pm 0.66 \text{ pg/mL}$  升高( $P < 0.01$ )。**结论** BCG 能明显抑制哮喘小鼠气道的炎症反应,其干预机制可能与促进调节性 T 细胞生成有关。  
[中国当代儿科杂志,2006,8(5):413-416]

**[关键词]** 卡介苗;调节性 T 细胞;白细胞介素 10;哮喘;小鼠

**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)05-0413-04

### Effect of bacillus calmette-guerin treatment on airway inflammation and T regulatory cells in mice with asthma

XIA Yu, ZHANG Jian-Hua, JI Zheng-Hua, LI Xiao-Di, YU Zhi-Wei, LIU Hai-Yan. Department of Pediatrics, People's Hospital of Lishui County, Nanjing 211200, China (Email: Zhang J-H, Email: zjh12195@yahoo.com.cn)

**Abstract: Objective** Previous studies have shown that bacillus calmette-guerin (BCG) can deviate Th2 response toward Th1 response, resulting in a suppressive effect on the development of asthma/atopy. This study examined the effect of BCG treatment on regulatory T cells in asthmatic mice to investigate the possible mechanism. **Methods** Kunming mice were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) to establish asthmatic models. Asthmatic mice were injected intradermally with BCG five days before and after sensitization. After 24 hrs of last challenge, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and peripheral blood were collected. The total cells and eosinophils were counted in the BALF. The percentage of CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup> in peripheral blood was detected with flow cytometry. Single spleen cell suspension was prepared and cultured in 1640 medium for 48 hrs and then the cytokine IL-10 level in the supernatant was determined using ELISA. The mice which were challenged with normal saline were used as the Normal control group. **Results** The number of total cells and eosinophils in BALF in asthmatic mice [ $(27.27 \pm 5.36) \times 10^7/L$  and  $(6.59 \pm 1.32) \times 10^7/L$  respectively] were more than in the Normal control group [ $(1.52 \pm 0.36) \times 10^7/L$  and zero respectively] ( $P < 0.01$ ). The number of total cells and eosinophils in BALF in asthmatic mice were reduced after BCG treatment [ $(13.71 \pm 3.17) \times 10^7/L$  and  $(1.43 \pm 0.37) \times 10^7/L$  respectively] ( $P < 0.01$ ). The percentage of CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup> in peripheral blood of asthmatic mice [ $(11.59 \pm 1.33)\%$ ] was noticeably lower than that of the Control group [ $(13.66 \pm 1.68)\%$ ] ( $P < 0.01$ ), but increased significantly in asthmatic mice after BCG treatment [ $(14.40 \pm 2.70)\%$ ] ( $P < 0.05$ ). The IL-10 level in spleen cell supernatant in the BCG-treated group ( $7.79 \pm 1.34 \text{ pg/mL}$ ) also increased compared with that in the untreated asthmatic mice ( $5.54 \pm 0.66 \text{ pg/mL}$ ) ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** BCG can markedly inhibit the airway inflammation in

[收稿日期]2006-01-10;[修回日期]2006-03-22

[作者简介]夏煜,男,硕士,主治医师。主攻方向:小儿哮喘的研究。

[通讯作者]张建华,主任医师,上海第六人民医院儿科,邮编:215003。

asthmatic mice possibly by promoting the production of regulatory T cells.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8 (5): 413-416]

**Key words:** Bacillus calmette-guerin; Regulatory T cell; IL-10; Asthma; Mice

哮喘 (asthma) 是以气道内嗜酸性粒细胞 (EOS) 浸润和气道高反应 (BHR) 为特征的慢性疾病。大量研究证据表明, Th2 细胞过度增殖、活化而分泌 IL-4, IL-5 等细胞因子是引起哮喘的主要原因。实验证实减毒活菌卡介苗 (BCG) 能抑制 Th2 型免疫反应而上调 Th1 型免疫反应, 促进 Th1 型细胞因子如 IFN- $\gamma$  的分泌而抑制气道炎症反应。目前, 哮喘发病的 Th1/Th2 模式受到质疑, 调节性 T 细胞功能低下可能与哮喘的形成有关。本实验利用成熟的小鼠哮喘模型, 观察哮喘小鼠外周血调节性 T 细胞 (Treg) 的变化及 BCG 对其的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与试剂

昆明小鼠 (购自苏州大学动物实验中心) 6~8 周, 体重 18~22g, 雄性。卵白蛋白 (OVA, Grade II), 购自美国 Sigma 公司; 氢氧化铝粉购自上海浦山化工公司; 小鼠 IL-10 ELISA 试剂盒, 购自深圳晶美公司。减毒活菌卡介苗 (BCG, 0.25mg/支) 购自上海生物制品研究所; PE-CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 抗体、FITC-CD<sub>25</sub><sup>+</sup> CD<sub>25</sub><sup>+</sup> 抗体购自 BioLegend 公司。

### 1.2 哮喘动物模型的建立

全部实验动物分为 3 组, 每组 8 只。哮喘组: 哮喘小鼠模型的建立方法参照 Dandurand 等<sup>[1]</sup> 的报道, 即第 0 天给予 10% OVA 0.1 mL 及 10% 氢氧化铝 0.2 mL 腹腔注射致敏, 第 14 天加强致敏 1 次, 于第 21 天起将小鼠放于自制的雾化吸入箱内使其吸入 5% OVA 的 20 min, 每天 1 次, 共 7 d。BCG 干预组: 哮喘小鼠动物模型的建立同哮喘组, 在致敏前及后 5 d 分别给予 BCG 0.025 mg 皮内注射干预。正常对照组: 以生理盐水代替 OVA 致敏激发小鼠。所有小鼠在最后一次激发 24 h 后腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.6g/kg) 麻醉后获取标本。

### 1.3 肺泡灌洗液 (BALF) 细胞计数及分类

小鼠颈部皮肤切开暴露气管, 插入留置针, 以 1 mL 生理盐水灌洗全肺, 回收灌洗液, 反复 3 次, 回收约 2 mL。将 BALF 离心 (20℃, 2 000 r/min, 10 min) 弃上清, 加 1640 培养液至 0.5 mL, 进行细胞计数, 获取细胞总数。取 0.2 mL 涂片, 瑞吉染液染色, 计数 200 个细胞, 计算嗜酸性粒细胞总数, 获取百分比。

### 1.4 脾细胞培养及细胞因子的测定

打开小鼠腹腔无菌取脾, 置于 2 mL 1640 培养液中, 用镊子将脾脏轻轻挤压成碎块, 自然下沉 10 min 后, 吸取上层细胞悬液 (弃下层的组织块), 1 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清液, 将沉淀的细胞用 1640 1 mL 重悬, 获取脾单细胞悬液, 将脾单细胞悬液悬于含小牛血清的 1640 培养液中, 并以每孔 2 mL 置于 48 孔细胞培养板中, 调节细胞终浓度为  $2 \times 10^6$ /mL, 另加 200 mg/L OVA 作为特异的刺激物。培养板置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 48 h, 48 h 后收集上清液, ELISA 检测试剂盒测定上清液中 IL-10 的水平。

### 1.5 流式细胞仪检测

心脏穿刺取血 1.0 mL, 肝素抗凝, 制备上机样品; 取 100  $\mu$ L 样品加入上机试管底部, 加入单克隆抗体 20  $\mu$ L 并与标本充分混匀; 室温避光孵育 20 min, 加入 500  $\mu$ L 红细胞裂解液, 旋涡振荡器充分混匀; 室温静置 20 min, 加入 500  $\mu$ L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 充分混匀, 再静置 20 min 后上机检测 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup> 双阳性 T 淋巴细胞占外周血有核细胞的百分比。

### 1.6 统计学处理

全部数据使用 SPSS10.0 统计软件分析, 检测数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验处理实验结果, 比较各组资料差异的显著性, *P* < 0.05 作为显著性差异水平。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠 BALF 细胞总数及 EOS 的变化

经 OVA 致敏激发的哮喘小鼠肺泡灌洗液 (BALF) 中的细胞总数及嗜酸粒细胞数与正常对照组相比较差异有显著性 (*P* < 0.01)。而经 BCG 干预的哮喘小鼠其 BALF 中的细胞总数及嗜酸粒细胞数明显下降, 与哮喘小鼠相比差异有显著性 (*P* < 0.01)。提示 BCG 能抑制哮喘小鼠的气道炎症。(表 1)

### 2.2 各组小鼠外周血 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup> 调节性 T 细胞的变化

哮喘组小鼠外周血 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Treg 的比例较正常对照组明显下降, 两组相比有统计学意义 (*P* < 0.05)。而 BCG 干预组外周血 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Treg 的比例明显上升 (*P* < 0.05), 与哮喘组相比差异有显著性 (*P* < 0.05)。(表 2)

表1 BALF 细胞总数及 EOS 的变化

| 组别      | 鼠(只) | BALF 细胞总数<br>( $\times 10^7/L$ ) | EOS 绝对计数<br>( $\times 10^7/L$ ) |
|---------|------|----------------------------------|---------------------------------|
| 正常对照组   | 8 只  | $1.52 \pm 0.36$                  | 0                               |
| 哮喘组     | 8 只  | $27.27 \pm 5.36^a$               | $6.59 \pm 1.32^a$               |
| BCG 干预组 | 8 只  | $13.71 \pm 3.17^{a,b}$           | $1.43 \pm 0.37^{a,b}$           |

a 与正常对照相比  $P < 0.01$ ; b 与哮喘组比较  $P < 0.01$

表2 外周血  $CD_4^+CD_{25}^+$  调节性 T 细胞的变化

| 组别      | 鼠(只) | Treg(%)            |
|---------|------|--------------------|
| 正常对照组   | 8 只  | $13.66 \pm 1.68$   |
| 哮喘组     | 8 只  | $11.59 \pm 1.33^a$ |
| BCG 干预组 | 8 只  | $14.40 \pm 2.70^b$ |

a 与正常组比较  $t = 2.605, P < 0.05$ ; b 与哮喘组比较  $t = 2.736, P < 0.05$

### 2.3 脾细胞培养上清液中 IL-10 的水平

哮喘组上清液中 IL-10 水平较正常对照组下降, 差异有显著性( $P < 0.01$ ); 而干预组小鼠 IL-10 水平较哮喘组上升, 差异有显著性( $P < 0.01$ )。(表3)

表3 小鼠脾细胞上清液中 IL-10 的水平

| 组别      | 只 | IL-10 (pg/mL)     |
|---------|---|-------------------|
| 正常对照组   | 8 | $6.99 \pm 0.91$   |
| 哮喘组     | 8 | $5.54 \pm 0.66^a$ |
| BCG 干预组 | 8 | $7.79 \pm 1.34^b$ |

a 与对照组比较  $t = 3.657, P < 0.01$ ; b 与哮喘组比较  $t = 4.244, P < 0.01$

## 3 讨论

哮喘是多种因素参与的气道慢性炎症, 其主要病理特点是气道高反应性及嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润。目前儿童哮喘发病率日益增高, 提示环境的改变起着重要的作用。卫生学说认为, 婴幼儿由于接触感染性刺激的机会少, 导致的体内 Th1/Th2 型免疫反应功能失调, 是诱发哮喘发作的一个原因。虽然 Th1/Th2 平衡的变化为我们理解哮喘的发病机制提供了一个简单的模式, 但是哮喘的发病远非 Th1/Th2 模式那么简单。近年来, 环境的变化不仅使以 Th2 型免疫反应为主的过敏性疾病的发病率增高, 同时以 Th1 型免疫反应为主的自身免疫性疾病的发病率同时也增高, 这表明我们仍需进一步研究哮喘与微生物感染的关系。

本研究结果表明 BCG 能明显抑制哮喘小鼠的气道炎症, 具体表现为 BCG 干预的哮喘小鼠其 BALF 中的细胞总数及嗜酸粒细胞数较哮喘组明显下降。同时发现 OVA 致敏激发的哮喘小鼠外周血  $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 的比例较正常对照组明显下降, 从

而削弱了其对免疫系统的调节作用。而经 BCG 感染的小鼠的  $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 的比例较哮喘组提高, 因此推测 BCG 可能通过  $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 来抑制气道的炎症反应。同样, 各组小鼠脾细胞培养上清液中的 IL-10 的水平也发生类似的变化, 表明  $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 可能通过 IL-10 维持其免疫抑制作用。

$CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 是机体内调节性 T 细胞的重要组成部分, 表面表达  $CD_{25}$  分子(IL-12 受体的  $\alpha$  链)及抑制分子 CTLA-4, 参与对机体免疫平衡的调节。其有两种重要的功能, 第一抑制对机体造成损害的免疫反应; 第二诱导机体对外部抗原或自身抗原的无反应性(no-responsive)。 $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 细胞通过 CTLA-4 介导的细胞与细胞表面的直接接触或者通过 IL-10、TGF- $\beta$  等细胞因子实施其调抑功能。许多动物试验表明 Treg 在预防及控制 Th2 型免疫反应中起着潜在的作用。小鼠  $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 体外不仅可抑制初始 T 淋巴细胞向 Th2 定向分化, 而且可抑制已分化的 Th2 细胞分泌细胞因子<sup>[2]</sup>。给具有单克隆 T 细胞与 B 细胞亚群的转基因小鼠注射单一的抗原刺激可产生高水平的 IgE 水平, 而这种免疫反应可被  $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 所阻止, 这说明  $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 能够抑制 IgE 反应<sup>[3]</sup>。一系列的实验研究表明在胸腺发育成熟天然存在于体内的  $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 的数量不足于控制过敏性气道炎症性疾病<sup>[4,5]</sup>,  $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 在外周可通过  $CD_4^+CD_{25}^+$  T 细胞成功诱导出, 并且表达 Foxp3 转录因子, 这些获得性  $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 在动物实验中可阻止屋尘螨介导的气道炎症<sup>[6]</sup>。将过敏患者与非过敏患者的  $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 分别与自体受特异过敏原刺激的  $CD_4^+CD_{25}^+$  T 淋巴细胞共培养, 前者的  $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 抑制  $CD_4^+CD_{25}^+$  T 淋巴细胞的增殖反应能力明显弱于后者<sup>[7]</sup>。在对食物过敏的研究中, 对食物耐受的形成往往与  $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 的增多有关<sup>[8]</sup>。这些研究表明  $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 可抑制机体 T 淋巴细胞的增殖反应, 并且在过敏性哮喘患者  $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 的抑制功能可能存在缺陷。

虽然起初 IL-10 被认为是一个 Th2 型细胞因子, 但是现在多数学者将它视为一个有力的免疫反应调节因子。一方面, 抗原提呈细胞分泌 IL-10, 调控 Th0 向 Treg 的定向分化及增殖, 另一方面, Treg 分泌 IL-10 参与对免疫反应的调节<sup>[9]</sup>。IL-10 基因敲除的  $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 细胞不能抑制幽门杆菌感染所导致的肠道炎症, 表明  $CD_4^+CD_{25}^+$  Treg 是 IL-10 的重要来源细胞<sup>[10]</sup>。IL-10 可抑制单核细胞释放 IL- $\alpha$ , IL-1B, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF 等促炎细胞

因子,同时还可下调巨噬细胞、树突状细胞表面MHC II类分子及共刺激分子的表达。在哮喘实验性研究中,IL-10可抑制过敏原激发后的Th2型细胞因子的释放及气道嗜酸性粒细胞的浸润<sup>[11]</sup>;而IL-10基因敲除的小鼠在过敏原激发后表现为气道炎症反应的加剧<sup>[12]</sup>。给经OVA致敏、激发的BALB/C小鼠预先注射人工合成表达IL-10的OVA特异的CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T辅助细胞,可消除小鼠的气道高反应性及嗜酸性粒细胞浸润<sup>[13]</sup>。哮喘患者的支气管肺泡灌洗液中的IL-10的水平降低,同时,用脂多糖(LPS)体外刺激这些患者的血单个核细胞(PBMC)其产生IL-10的反应较正常人降低<sup>[14]</sup>。这些研究结果表明IL-10对哮喘起抑制调控作用。

因此,作为强有力的Th1反应刺激剂,BCG对哮喘气道炎症的抑制作用得到了广泛的关注,大多数研究表明,BCG可提高机体的分泌IFN- $\gamma$ 的Th1反应能力,从而抑制引起哮喘等过敏性疾病的Th2反应。但对是否会诱导机体Treg的生成的报道不多。Moseman<sup>[15]</sup>利用PAMPs分子B型CPG-ODN活化从人血分离的DC细胞表面表达的TOLL样受体9(Toll like receptor TLR9),诱导CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Treg的生成。Zuany-Amorim<sup>[16]</sup>在用灭活分枝杆菌悬液干预哮喘小鼠时,通过Treg的生成可明显抑制抗原致敏激发小鼠的气道炎症。TLR2介导分枝杆菌(包括BCG)感染的信号传导。分枝杆菌、BCG等细胞壁中的肽聚糖、阿拉伯甘露聚糖脂等均是TLR2的配体,与表达在DC表面的TLR2结合,诱导DC的成熟,并分泌IL-10等细胞因子,促使Th0向Treg分化。另外,BCG感染的信号可上调CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Treg的表面TLRS的表达,促进其增殖<sup>[17]</sup>。而我们的实验同样表明,对OVA致敏、激发的小鼠预先注射BCG干预,可诱导小鼠外周血CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Treg的增多,继而对过敏性气道炎症起控制作用。

大量流行病学调查与实验研究均证实了儿童早期微生物感染与哮喘的发病率呈负相关。但是其作用机制还需进一步探索。我们的研究表明,Treg调抑功能的缺陷,可能是哮喘发作的一个原因。而某些微生物感染,如分枝杆菌、乳酸杆菌等可诱导Treg的生成,对哮喘气道炎症起抑制作用<sup>[18,19]</sup>。

#### [参 考 文 献]

[1] Dandurand RJ, Wang CG, Laberge S, Martin JG, Eidelman DH. In vitro allergic bronchoconstriction in the brown Norway rat[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1994(6): 1499-1505.  
[2] Stassen M, Jonuleit H, Müller C, Klein M, Richter C, Bopp T, et al. Differential regulatory capacity of CD<sub>25</sub><sup>+</sup>T regulatory cells

and preactivated CD<sub>25</sub><sup>+</sup>T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of TH2 cells [J]. J Immunol, 2004, 173(1): 267-274.  
[3] Curotto de Lafaille MA, Muriglan S, Sunshine MJ, Lei Y, Kutchukhidze N, Furtado GC, et al. Hyper-immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes[J]. J Exp Med, 2001, 194(9): 1349-1359.  
[4] Jaffar Z, Sivakuru T, Roberts K. CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>T cells regulate airway eosinophilic inflammation by modulating the TH2 cell phenotype[J]. J Immunol, 2004, 172(6): 3842-3849.  
[5] Hadeiba H, Locksley RM. Lung CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>regulatory T cells suppress type 2 immune responses but not bronchial hyperreactivity [J]. J Immunol, 2003, 170(11): 5502-5510.  
[6] Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>-</sup>naive T cells to CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3[J]. J Exp Med, 2003, 198(12): 1875-1886.  
[7] Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. Relation of CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>regulatory T-cell suppression of allergen-derived T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease[J]. Lancet, 2004, 363(9409): 608-615.  
[8] Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy[J]. J Exp Med, 2004, 199(12): 1679-1688.  
[9] Akbari O, Dekruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen[J]. Nat Immunol, 2001, 2(8): 725-731.  
[10] Kullberg MC, Jankovic D, Gorelick PL, Caspar P, Letterio JJ, Cheever AW, et al. A. Bacteria-triggered CD4(+) T regulatory cells suppress Helicobacter hepaticus-induced colitis[J]. J Exp Med, 2002, 196(4): 505-515.  
[11] van Scott MR, Justice JP, Bradfield JF, Enright E, Sigounas A, Sur S. IL-10 reduces TH2 cytokine production and eosinophilia but augments airway reactivity in allergic mice[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 278(4): 667-674.  
[12] Tournay KG, Kips JC, Pauwels RA. Counterbalancing of TH2-driven allergic airway inflammation by IL-12 does not require IL-10 [J]. J Allergy Clin Immunol, 2001, 107(3): 483-491.  
[13] Oh JW, Seroogy CM, Meyer EH, Akbari O, Berry G, Fathman CG, et al. CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation[J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 110(3): 460-468.  
[14] Borish L. IL-10: evolving concepts[J]. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101(3): 293-297.  
[15] Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>regulatory T cells[J]. J Immunol, 2004, 173(7): 4433-4442.  
[16] Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C, Le Moine A, Brunet LR, Kemeny DM, et al. Suppression of airway eosinophilia by killed Mycobacterium vaccae-induced allergen-specific regulatory T-cells[J]. Nat Med, 2002, 8(6): 625-629.  
[17] Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide [J]. J Exp Med, 2003, 197(4): 403-411.  
[18] 李志辉,辛淑君,黄婷,叶庆标,王影齐,陈冬梅.卡介苗多糖核酸对毛细支气管炎喘息反复发作的预防作用[J].中国当代儿科杂志,2003,5(4):328-330.  
[19] 孔祥永,郭杰,贾天明,郭铭玉.支气管哮喘患儿T细胞亚群和免疫球蛋白变化[J].中国当代儿科杂志,2000,2(2):68-70.

(本文编辑:吉耕中)